

ROBERT ANDREATA SANTOS

**Avaliação de formulações vacinais anti-dengue administradas pela via
transcutânea visando à geração de anticorpos neutralizantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão Original

São Paulo
2017

RESUMO

Santos RA. Avaliação de formulações vacinais anti-dengue administradas pela via transcutânea visando à geração de anticorpos neutralizantes. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Universidade de São Paulo; Instituto de Ciências Biomédicas; 2017.

A dengue é uma arbovirose que ameaça mais de metade da população mundial. No momento existem duas vacinas, administradas por vias parenterais, aprovada ou em estudos clínicos, que podem conferir proteção parcial em regiões endêmicas, mas que ainda não estão sendo administradas em larga escala. Por outro lado, a utilização de vias de administração alternativas, como a via transcutânea (TC), pode ter um impacto importante na eficácia vacinal. A entrega de formulações vacinais pela via TC tem como vantagem a administração segura e não invasiva de antígenos vacinais e a composição celular específica da pele, rica em células apresentadoras de antígenos, como as células de Langerhans; O presente estudo avaliou as respostas de anticorpos geradas em camundongos após imunização pela via TC com partículas virais de vírus dengue do sorotipo 2 (DENV2). Os antígenos foram combinados com a toxina termolábil (LT) recombinante, usada como adjuvante vacinal e originalmente produzida por linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). Os resultados indicam que a vacina com vírus inativados, administrada pela via TC, mostrou-se imunogênica, porém apenas uma pequena fração dos anticorpos produzidos foi direcionada contra o ectodomínio III (EDIII) da proteína do envelope viral, responsável pela ligação do vírus à célula. A incorporação do adjuvante LT resultou no aumento da produção de anticorpos específicos e na modulação da qualidade das respostas imunológicas. Os anticorpos produzidos após as imunizações apresentaram prevalência da subclasse IgG1, sendo a razão entre IgG1/IgG2a modificada após a introdução do adjuvante LT. Com a adaptação das formulações vacinais administradas e, quando comparada com uma via parenteral, a via TC mostrou-se capaz de induzir níveis semelhantes de proteção e morbidade frente a desafio letal. O presente estudo demonstra que a via TC pode induzir respostas sorológicas vírus-específicas de forma eficiente quando utilizada para a administração de vacinas contra DENV baseadas em partículas virais. Portanto, novos estudos devem ser feitos considerando a TC como uma via de administração alternativa às vias parenterais para a administração de vacinas contra a dengue.

Palavras-chave: Transcutânea. Dengue. Vacina. Vírus inativado. Toxina termolábil.

ABSTRACT

Santos RA. Evaluation of anti-dengue vaccine formulations administered by the transcutaneous route aiming the generation of neutralizing antibodies. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Universidade de São Paulo; Instituto de Ciências Biomédicas; 2017.

Dengue is an arbovirolosis that threatens more than half the world's population. Currently there are two vaccines, both administered via parenteral routes, approved or in clinical trials, which provide partial protection but are not being administered on a large scale. On the other hand, the use of alternative routes of administration, such as the transcutaneous (TC) route, can have a significant impact on vaccine efficacy. Delivery of vaccine formulations via the TC route has the advantage of a safe and non-invasive administration method of vaccine antigens through the skin, that has a cell composition rich in antigen-presenting cells, such as the Langerhans cells. The present study evaluated the antibody responses generated in mice after TC immunization with virus particles of dengue virus serotype 2 (DENV2). The antigens were combined with a recombinant form of the heat-labile toxin (LT), used as a vaccine adjuvant and originally produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains. The results indicate that the inactivated virus vaccine administered via the TC pathway was immunogenic, but only a small fraction of the antibodies were directed against the ectodomain III (EDIII) of the viral envelope protein, which is responsible for the binding of the virus to host cells. Incorporation of LT resulted in increased production of specific antibodies and modulation of the immune responses. Antibodies produced after the immunizations showed a prevalence of the IgG1 subclass, with the IgG1/IgG2a ratio being modified after the introduction of LT. When compared with a parenteral route, the TC route was capable to induce similar protection levels to a lethal challenge. The present study demonstrates that the TC route can efficiently induce virus-specific serological responses when used for administration of DENV vaccines based on viral particles. Further studies should explore different dengue vaccines using the TC route as an alternative to parenteral administration routes.

Keywords: Transcutaneous. Dengue. Vaccine. Inactivated virus. Heat-labile toxin.

1 INTRODUÇÃO

A presença de doenças virais acometendo humanos é datada desde a antiguidade, porém o termo arbovírus somente passou a ser empregado em 1881, quando o Dr. Carlos Finlay propôs a transmissão do vírus da febre amarela (YFV) por mosquitos (1). Dentre esses vetores destacam-se os mosquitos do gênero *Aedes*, em especial o *Aedes aegypti*, responsáveis pela transmissão de uma das arboviroses de maior importância no cenário nacional e mundial, causada pelo vírus da dengue (DENV) (2). Uma característica marcante da dengue é a subnotificação de casos, o que normalmente “esconde” boa parte das epidemias, já que uma grande parte dos infectados é assintomática ou desenvolve quadros leves de sintomas que não são suficientes para levá-los a procurar ajuda médica (3).

A primeira epidemia de DENV no Brasil foi reportada em 1845, muito provavelmente decorrente da epidemia asiática e das regiões do pacífico em 1779-1780 associada com mudanças geográficas que permitiram a expansão do vetor globalmente (3). Atualmente a dengue é uma de suas representantes de maior relevância econômica e epidemiológica, sendo que o Brasil apresentou a quinta maior incidência na América latina entre 1995 e 2009, e a maior incidência na América do Sul (juntamente com o Uruguai) em 2014, com cerca de 294 casos a cada 100.000 habitantes (4). No cenário global estima-se 390 milhões de infecções por ano, sendo que destas aproximadamente 96 milhões apresentam algum grau de severidade que evoluem para cerca de 30 mil mortes anuais (5–7).

A sintomatologia mostra-se decorrente de uma resposta imunológica anômala, a qual envolve múltiplos aspectos como imunocomplexos, leucócitos e citocinas que podem culminar em manifestações clínicas que variam desde sintomas brandos como a febre da dengue a sintomas severos que podem levar à morte (dengue severa), previamente conhecidos como síndrome de choque da dengue e/ou febre hemorrágica da dengue (8–10). Tais infecções concentram-se nas faixas tropicais e subtropicais do globo, representando a abrangência da presença dos vetores responsáveis por sua transmissão (10).

O DENV é pertencente à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, no qual também estão classificadas outras importantes arboviroses como a febre amarela e a encefalite japonesa. No ciclo urbano, o DENV circula na forma de quatro tipos imunologicamente distinguíveis

(sorotipos): DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, que apresentam aproximadamente 30% de divergência na sequência de nucleotídeos dos seus genomas (11–15). Tal espécie viral apresenta vírions esféricos e envelopados possuidores de RNA fita simples de orientação positiva como material genético (16). O genoma viral codifica uma poliproteína que sofre clivagem em dez proteínas distintas, dentre as quais sete não participam da composição da partícula viral, sendo caracterizadas como não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) e três compõem as partículas formadas, sendo caracterizadas como estruturais (E, prM e C) (FIG 1A). O envelope de um vírion maduro é em sua grande maioria composto pela proteína do envelope (E), mas também possui em sua composição a proteína M – resultante da clivagem da proteína precursora de membrana pela proteína furina (17) (FIG 1B).

A proteína E apresenta-se em dímeros no envelope viral e pode ser subdividida em três ectodomínios que possuem funções distintas durante o processo de adsorção e entrada em células infectadas (FIG 1C), destacando-se o ectodomínio III (EDIII), o qual é responsável pela ligação inicial do vírus aos receptores celulares. Devido ao fato do DENV infectar uma grande variedade de células, tanto de mosquitos quanto de humanos, a EDIII reconhece moléculas ubíquas nas membranas de superfície, como heparan sulfato e outras moléculas que medeiam a internalização em células hospedeiras (18). De forma específica, as partículas de DENV se ligam à proteína de choque térmico 70 em células de mosquito (18,19), ICAM3 em células dendríticas (DCs) imaturas, integrina na maioria das células de mamífero e resíduos de manose expressos na superfície de macrófagos (18,20). Tais características incentivam o extensivo estudo da EDIII como possível alvo de bloqueio da infecção viral em formulações vacinais (21,22).

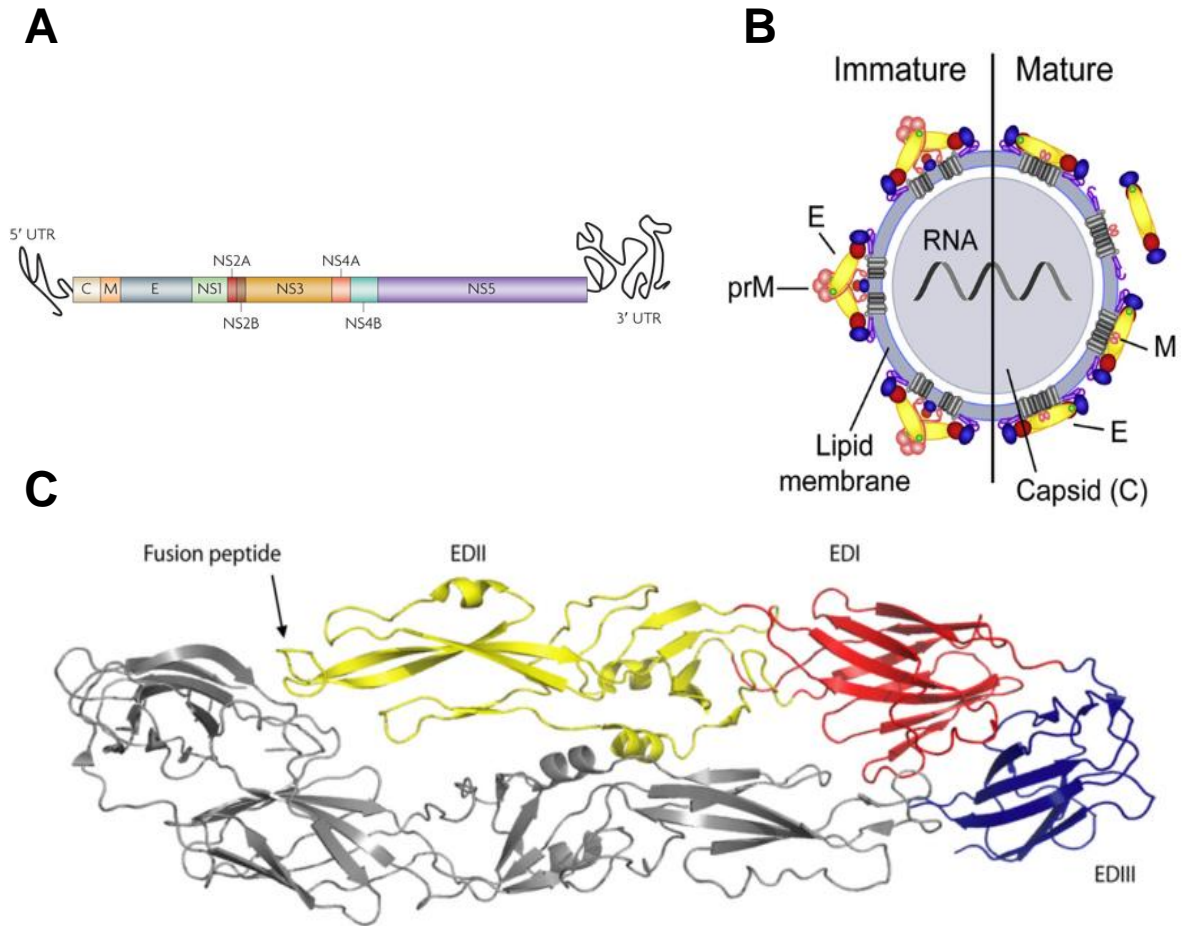


Figura 1 - Representações esquemáticas do DENV. (A) Genoma de RNA de fita simples, com orientação positiva, do DENV. A fita de RNA possui aproximadamente 11 kB e que codifica 10 proteínas, sendo três estruturais: Capsídeo (C), Membrana (M) e Envelope (E) e sete não estruturais (NS): NS1, NS2 A e B, NS3, NS4 A e B e NS5. (B) Modificação estrutural no vírion após a clivagem da proteína precursora de membrana (prM) em proteína M pela enzima furina, tornando a partícula madura. (C) Organização da proteína E em dímeros após a maturação da partícula viral e representação dos três diferentes domínios presentes na proteína: Domínio 1 (EDI), domínio 2 (EDII) e domínio 3 (EDIII). Referências modificadas: Wahala, 2012; Guzman, 2010; Heinz 2012 (21,108,109).

A busca por formulações vacinais que produzam respostas eficientes contra uma infecção gerada por partículas virais viáveis do DENV já foi feita com a utilização de diversos tipos de antígeno alvo (8,23). As principais abordagens vacinais em desenvolvimento incluem vírus vivos atenuados e vacinas baseadas em vírus quiméricos atenuados recombinantes e apresentam-se em estudos de fase clínica e liberadas para uso em humanos, respectivamente. Contudo, o desenvolvimento de tais formulações vacinais envolve necessidades logísticas e operacionais que elevam o custo de produção, armazenamento e distribuição dos lotes, o que dificultam a utilização em locais de difícil acesso. Outro ponto importante consiste na evasão da vacinação por parte de indivíduos que temem procedimentos invasivos (injeções), bem como os riscos de

acidentes e transmissão de agentes infecciosos a que a manipulação desses materiais perfurocortantes está sujeita. Tais fatos abrem caminho para estudos que tem por objetivo a utilização de diferentes vias de inoculação vacinal, destacando-se a vias de administração não invasivas, como a via transcutânea (TC).

A epiderme representa a porção mais externa da pele, consiste no sítio de inoculação TC, e pode ser dividida em duas partes. O *stratum corneum* consiste na porção em contato direto com o meio externo, possuindo desta forma propriedades únicas de impermeabilidade que o tornam fundamental na proteção contra agentes invasores (24,25). A composição do *stratum corneum* consiste de corneócitos mortos ligados por desmossomos e complexos de proteínas celulares. Logo abaixo do *stratum corneum* localiza-se a epiderme viável, composta principalmente de queratinócitos e abundantes quantidades de células dendríticas como melanócitos e Células de Langerhans (LCs) (26).

Apesar de sua grande extensão a pele pode ser considerada um sítio ativo e eficaz na proteção do organismo. A função de imunidade inata é feita principalmente pelos queratinócitos presentes na epiderme, os quais possuem capacidade de produzir citocinas, quimiocinas e fatores antimicrobianos responsáveis pelo controle de invasões e recrutamento de células do sistema imunológico para o local, de forma a erradicar o agente causador de alerta (24,26). As células dendríticas imaturas presentes na camada basal da epiderme e na derme formam uma rede que cobre a extensão da pele e possuem ação crítica na iniciação de respostas contra organismos invasores (27). Tais células podem sofrer ativação por meio da detecção de seres estranhos ou estimulação feita pelas células do tecido e compõem o elo de ligação entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa. As LCs diferenciam-se de outras células dendríticas pela sua capacidade de expressar langerinas (CD207) e são capazes de reconhecer oligossacarídeos e formar grânulos visíveis no citoplasma celular (grânulos de Birbeck) (28). O reconhecimento das LCs por células do sistema imunológico após sua migração para órgãos linfóides pode ser feito por antígeno leucocitário humano (HLA) de classe I e II, o que permite o desenvolvimento de respostas completas, com a predominância de anticorpos ou de respostas celulares citotóxicas. A via TC tem sido explorada como alternativa para administração de vacinas e drogas em seres humanos, como demonstram uma série de testes clínicos conduzidos ou andamento em diversas partes do mundo (Tabela 1).

Tabela 1 - Estudos clínicos envolvendo administração de vacinas e fármacos em humanos pela via TC.

Estado	Nome do estudo	Condição	Intervenção
Desconhecida	Imunogenicidade de três HIV GTU® MultiHIV imunizações de DNA administradas via rotas i.m., ID e TC	HIV	GTU®- multi HIV clado B
Finalizado	Estudo de segurança comparando a administração de vacinas pela via TC com a via i.m.	Voluntários saudáveis; HIV	Administrações TC e i.m.
Finalizado	Imunização transcutânea com vetor vicinal de <i>Listeria Monocytogenes</i>	Voluntários saudáveis	BMB72 (actA/plcB-deleted <i>Listeria monocytogenes</i> expressando nucleoproteína de influenza A)
Finalizado	Ensaio logístico de ETEC	Diarreia	Toxina termolábil de <i>Escherichia coli</i> (LT); Placebo
Finalizado	Vias de imunização e respostas imunológicas contra Influenza	Influenza	INTANZA® 15; Vaxigrip®; INTANZA® 15 T
Finalizado	A segurança e a imunogenicidade da vacina DNA-GTU administrada em pacientes infectados por HIV em regime ART vs placebo	HIV	Vacina GTU®-MultiHIV Clado B; Cloreto de sódio
Finalizado	Terapia vicinal e resiquimod no tratamento de pacientes com estágio II, III ou IV de melanoma completamente removido cirurgicamente	Melanoma (pele)	Resiquimod
Finalizado	Estudo de segurança de vacina recombinante para prevenção de diarreia provocada por ETEC	Infecção por <i>Escherichia Coli</i>	Adesina fimbrial recombinante dscCfaE; LT modificada LTR192G
Finalizado com resultados	Estudo de autoadministração de adesivo vicinal de LT	Prevenção da diarreia do viajante	LT
Ativo, sem recrutamento	Estudo de segurança de vacina quimérica para prevenção de diarreia provocada por ETEC	Infecção por <i>Escherichia Coli</i>	Adesina fimbrial recombinante dsc14CfaE-sCTA2/LTB5; dscCfaE; LT modificada LTR192G
Finalizado com resultados	Processo automatizado da diarreia do viajante	Prevenção da diarreia do viajante	LT; Placebo
Finalizado com resultados	Estudo de segurança estratificado por gênero e estudo de imunogenicidade	Diarreia	LT; Placebo

Tabela 1 - Estudos clínicos envolvendo administração de vacinas e fármacos em humanos pela via TC.

Finalizado com resultados	Respostas imunológicas da vacinação contra YFV em adultos com dermatite atópica	Dermatite atópica	Vacina da febre amarela (YFV-17D); YFV-17D Placebo
Finalizado	Estudo de imunoterapia específica contra alérgeno com administração epicutânea em alérgicos a pólen de grama	Rinoconjuntivite alérgica	Adesivo; Adesivo placebo

O vencimento da barreira inicial imposta pelo *stratum corneum* é um importante fator a ser considerado em imunizações pela via TC e por isso foi amplamente estudado no âmbito da criação de novas tecnologias que permitam a passagem dos antígenos alvo e entrega ao sistema imunológico. Diversas alternativas foram desenvolvidas para tal propósito e envolvem o emprego do rompimento ou permeabilização da camada superficial de células, a utilização de métodos de entrega de antígenos ou microagulhas. O rompimento das camadas superficiais de células pode ser feito por abrasão superficial e consiste no principal meio de entrada de organismos estranhos, podendo ser utilizado para ultrapassar a barreira do *stratum corneum* (29). A permeabilização pode ser feita com a utilização de adesivos contendo antígenos, os quais ficam expostos a longos períodos no tecido (30). Os métodos de entrega de antígenos possuem variações quanto aos modelos utilizados, sendo já caracterizados para o uso em imunizações pela via TC sistemas baseados em lipossomas e vetores virais, como os adenovírus e os vírus ankara (31,32). A criação das microagulhas foi proposta como forma para promover a ruptura local das camadas iniciais da pele o suficiente para não causarem dor e ao mesmo tempo apresentarem antígenos aderidos às camadas da epiderme que contenham células do sistema imunológico (32,33).

Dentre os candidatos vacinais estudados nas imunizações pela via TC, inicialmente predominavam os antígenos bacterianos, o que permitiu o estabelecimento da via como promissora na geração de respostas imunológicas. Além disto, diversos estudos vacinais têm explorado a utilização de partículas virais, e seus derivados, aplicados via TC utilizando diferentes métodos para a transposição da barreira representada pelo *stratum corneum* na tentativa de apresentar o antígeno com uma melhor qualidade e eficiência para o sistema imunológico (29–35).

Os vírus mostraram-se promissores como desencadeadores de respostas imunológicas devido ao tamanho, apresentando grande facilidade de apresentação ao sistema imunológico (29,36).

Vacinas de DNA administradas de forma tópica induziram respostas de anticorpos e células produtoras de IFN- γ contra o vírus sincicial respiratório (RSV) (37). A proteína hexon (principal proteína de capsídeo em adenovírus) induziu proteção em camundongos imunizados com adesivos vacinas (38). Partículas virais inteiras inativadas ou proteínas recombinantes do vírus simples herpes (HSV) geraram respostas humorais no soro e nas fezes e fortes respostas celulares, respectivamente, em camundongos após vacinação via TC (35). Diversas plataformas de administração obtiveram resultados positivos contra Influenza quando utilizada a via TC, o que resultou na realização de testes clínicos (Tabelas 1, 2). Antígenos do vírus Hepatite B (HBV) mostraram-se promissores na geração de respostas imunológicas em diferentes estratégias de apresentação do antígeno pela via TC (Tabela 2). Vacina de DNA contra o vírus da Encefalite Japonesa (JEV) promoveu a geração de resposta de anticorpos protetores contra a infecção após administração tópica (39). Contudo, mesmo com a utilização de diferentes métodos para entrega antigênica pela via TC, foi confirmada a necessidade de utilização de adjuvantes vacinais para obtenção de uma resposta imunológica mais robusta e direcionada (40).

Tabela 2 - Diferentes tipos de estratégias vacinais baseadas na via TC que empregaram antígenos virais.

Candidato Vacinal	Estratégia	Referências
RSV	DNA total encapsulado com transferossomo	(37)
Adenovírus	Adenovírus-luciferase em almofada de hidrogel	(38)
HSV	Vírus inteiro ou proteínas virais coadministrados com Toxina de Cólera (CT)	(35)
Influenza	Vírus inteiro inativado coadministrado com CT	(41)
	Vacina de DNA codificando proteína M Coadministrada com CPG ou CT	(42)
	Vacina de DNA codificando proteína M em diferentes formulações com ou sem tratamento da pele ou adição de lipossomas	(43)
	Peptídeo de Influenza direcionado para células T auxiliares coadministrado com CT	(44)
	Glicoconjugado com reatividade cruzada de <i>Haemophilus influenzae b</i> coadministrado com diferentes LT e CT	(45)
	Vacina Agripal contendo proteínas hemaglutinina e neuraminidase	(46)
	Comparação de vacinas tetravalentes inativadas de Influenza	(47)
HBV	Associação do antígeno de superfície do HBV (HBsAg) juntamente com lipossomas	(48)
	Plasmídeos fluorescentes expressando HBsAg encapsulados em lipossomas	(49)
	Plasmídeo codificando HBsAg complexado com lipossomas catiônicos	(50)
	Comparação de ethosomas e lipossomas contendo HBsAg encapsulado	(51)
	HBsAg encapsulado em lipossomas coadministrados com MDP	(52)
	HBsAg encapsulados em niossomas	(53)
JEV	Plasmídeos codificando as proteínas M e E encapsulados em lipossomas catiônicos	(39)

No contexto das imunizações pela via TC, as toxinas termolábeis (LTs) de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) representam uma alternativa promissora e eficaz na potencialização da resposta direcionada ao antígeno alvo. Estas são proteínas heterohexaméricas que consistem de uma subunidade A e cinco subunidades B (AB₅) e que apresentam grande efeito adjuvante, tanto no que se refere às respostas humorais quanto celulares, para antígenos administrados por via parenteral ou de mucosa (54). O efeito adjuvante das LTs deve-se à capacidade da subunidade B em ligar-se a receptores GM-1 presentes nas células epiteliais, de forma a facilitar sua internalização. Por processos ainda não muito bem conhecidos essa internalização leva a um aumento de AMP cíclico (AMPc) no citoplasma das células, uma reação associada à subunidade A, que resulta na produção de citocinas pró inflamatórias (26,29). Dessa forma um ambiente propício ao aumento das respostas direcionadas aos antígenos alvo é formado.

Diante de todas as alternativas apresentadas, combinações de antígenos derivados do DENV em combinação com LT, em formulações vacinais administradas pela via TC, podem representar uma alternativa promissora para a administração de vacinas para a prevenção da dengue.

2 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos pôde-se concluir que a via TC é capaz de gerar respostas imunológicas humorais em níveis elevados contra antígenos de dengue, sendo o adjuvante LT fundamental na potencialização e modulação das respostas geradas. Adicionalmente, vacinas baseadas em DENV2 NGC e desafiadas com o mesmo vírus induziram proteção em camundongos BALB/c imunocompetentes quando administradas pela via TC, porém, o mesmo não foi observado quando utilizado DENV2 JHA1. As vias TC e ID mostraram-se comparáveis em termos de proteção, sendo maior a robustez da resposta observada na via ID, e os menores efeitos deletérios causados pelas vacinas administradas pela via TC. Desta forma, o presente estudo demonstra que a utilização da via TC com antígenos de DENV é válida. Além disso, o emprego desta via de imunização traz vantagens econômicas e psicológicas, para o usuário, que devem ser consideradas.

REFERÊNCIAS*

1. Chaves-Carballo E. Carlos Finlay and yellow fever: triumph over adversity. *Mil Med.* 2005;170(September 2004):881–5.
2. Gubler DJ. Flaviviruses: Past, Present and Future. In: Shi P-Y, editor. *Molecular Virology and Control of Flaviviruses*. 1st ed. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2012. p. 1–7.
3. Fares RCG, Souza KPR, Añez G, Rios M. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015;2015:1–13. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/321873/>
4. Cafferata ML, Bardach A, Rey-Ares L, Alcaraz A, Cormick G, Gibbons L, et al. Dengue Epidemiology and Burden of Disease in Latin America and the Caribbean: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. *Value Heal Reg Issues* [Internet]. 2013 Dec;2(3):347–56. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212109913001295>
5. Stahl H-C, Butenschoen VM, Tran HT, Gozzer E, Skewes R, Mahendradhata Y, et al. Cost of dengue outbreaks: literature review and country case studies. *BMC Public Health* [Internet]. *BMC Public Health*; 2013;13(1):1048. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24195519>
6. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* [Internet]. *Nature Publishing Group*; 2013;496(7446):504–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3651993&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
7. Constenla D, Garcia C, Lefcourt N. Assessing the Economics of Dengue: Results from a Systematic Review of the Literature and Expert Survey. *Pharmacoeconomics* [Internet]. 2015 Jun 6 [cited 2015 Jun 19]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26048354>
8. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2007 Jul [cited 2016 Feb 13];5(7):518–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17558424>
9. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480–96.
10. World Health Organization (WHO). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Spec Program Res Train Trop Dis* [Internet]. :x, 147. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf
11. SMITH CEG. Isolation of three strains of type 1 dengue virus from a local outbreak of the disease in Malaya. *J Hyg (Lond).* 1956 Dec;54(4):569–80.
12. DIERCKS FH. Isolation of a type 2 dengue virus by use of hamster kidney cell cultures. *Am J Trop Med Hyg.* 1959 Jul;8(4):488–91.
13. MYERS RM, CAREY DE, RODRIGUES FM, KLONTZ CE. THE ISOLATION OF DENGUE TYPE 4 VIRUS FROM HUMAN SERA IN SOUTH INDIA. *Indian J Med Res.* 1964 Jun;52:559–65.
14. Chan YC, Kanapathipillai K, Chew KS. Isolation of two strains of dengue virus type 3 in Singapore. *Singapore Med J.* 1965 Sep;5(3):127–32.
15. Blok J. Genetic relationships of the dengue virus serotypes. *J Gen Virol.* 1985 Jun;66 (Pt 6):1323–5.
16. Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host Microbe* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;5(4):318–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.001>

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

17. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2010 Aug [cited 2015 Oct 29];67(16):2773–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20372965>
18. van der Schaar HM, Rust MJ, Waarts B-L, van der Ende-Metselaar H, Kuhn RJ, Wilschut J, et al. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *J Virol*. 2007;81(21):12019–28.
19. Ren J, Ding T, Zhang W, Song J, Ma W. Does Japanese encephalitis virus share the same cellular receptor with other mosquito-borne flaviviruses on the C6/36 mosquito cells? *Virology* [Internet]. 2007;4(1):83. Available from: <http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-4-83>
20. Lozach P-Y, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier J-L, et al. Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3-grabbing Non-integrin (DC-SIGN)-mediated Enhancement of Dengue Virus Infection Is Independent of DC-SIGN Internalization Signals. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Jun 24;280(25):23698–708. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M504337200>
21. Wahala WMPB, Huang C, Butrapet S, White LJ, de Silva a. M. Recombinant Dengue Type 2 Viruses with Altered E Protein Domain III Epitopes Are Efficiently Neutralized by Human Immune Sera. *J Virol*. 2012;86(7):4019–23.
22. Wan S-W, Lin C-F, Wang S, Chen Y-H, Yeh T-M, Liu H-S, et al. Current progress in dengue vaccines. *J Biomed Sci* [Internet]. *Journal of Biomedical Science*; 2013;20(1):37. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3686670&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
23. Schwartz LM, Halloran ME, Durbin AP, Longini IM. The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;33(29):3293–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X15006313>
24. Kirschner N, Brandner JM. Barriers and more: Functions of tight junction proteins in the skin. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1257(1):158–66.
25. Madison KC. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’EOE tre” of the Epidermis. *J Invest Dermatol*. 2003;121(2):231–41.
26. Bal SM, Ding Z, Van Riet E, Jiskoot W, Bouwstra J a. Advances in transcutaneous vaccine delivery: Do all ways lead to Rome? *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;148(3):266–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.09.018>
27. Banga AK. Transcutaneous Immunization. In: *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group; 2006. p. 338–40.
28. Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* [Internet]. 2000 Jan;12(1):71–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10661407>
29. Lee MY, Shin MC, Yang VC. Transcutaneous antigen delivery system. *BMB Rep*. 2013;46(1):17–24.
30. Guo L, Qiu Y, Chen J, Zhang S, Xu B, Gao Y. Effective transcutaneous immunization against hepatitis B virus by a combined approach of hydrogel patch formulation and microneedle arrays. *Biomed Microdevices*. 2013;15(6):1077–85.
31. Cheng JY, Huang HN, Tseng WC, Li TL, Chan YL, Cheng KC, et al. Transcutaneous immunization by lipoplex-patch based DNA vaccines is effective vaccination against Japanese encephalitis virus infection. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;135(3):242–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.01.014>
32. Vrdoljak A, McGrath MG, Carey JB, Draper SJ, Hill AVS, O’Mahony C, et al. Coated microneedle arrays for transcutaneous delivery of live virus vaccines. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;159(1):34–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.12.026>

33. Matsuo K, Hirobe S, Yokota Y, Ayabe Y, Seto M, Quan YS, et al. Transcutaneous immunization using a dissolving microneedle array protects against tetanus, diphtheria, malaria, and influenza. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;160(3):495–501. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.001>
34. Combadière B, Vogt A, Mahé B, Costagliola D, Hadam S, Bonduelle O, et al. Preferential amplification of CD8 effector-T cells after transcutaneous application of an inactivated influenza vaccine: A randomized phase I trial. *PLoS One*. 2010;5(5).
35. El-Ghorr A a., Williams RM, Heap C, Norval M. Transcutaneous immunisation with herpes simplex virus stimulates immunity in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;29(4):255–61.
36. Karande P, Mitragotri S. Transcutaneous immunization: an overview of advantages, disease targets, vaccines, and delivery technologies. *Annu Rev Chem Biomol Eng* [Internet]. 2010 Jan [cited 2016 Apr 2];1:175–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22432578>
37. Xu J, Ding Y, Yang Y. Enhancement of Mucosal and Cellular Immune Response in Mice by Vaccination with Respiratory Syncytial Virus DNA Encapsulated with Transfersome. *Viral Immunol* [Internet]. 2008 Dec;21(4):483–90. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vim.2008.0044>
38. Ishii Y, Nakae T, Sakamoto F, Matsuo K, Matsuo K, Quan Y-S, et al. A transcutaneous vaccination system using a hydrogel patch for viral and bacterial infection. *J Control Release* [Internet]. 2008 Oct;131(2):113–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365908003908>
39. Cheng J-Y, Huang H-N, Tseng W-C, Li T-L, Chan Y-L, Cheng K-C, et al. Transcutaneous immunization by lipoplex-patch based DNA vaccines is effective vaccination against Japanese encephalitis virus infection. *J Control Release* [Internet]. 2009 May;135(3):242–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365909000522>
40. Mittal A, Schulze K, Ebbesen T, Weißmann S, Hansen S, Lehr CM, et al. Efficient nanoparticle-mediated needle-free transcutaneous vaccination via hair follicles requires adjuvantation. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;11(1):147–54. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963414004328>
41. Skountzou I, Quan F-S, Jacob J, Compans RW, Kang S-M. Transcutaneous immunization with inactivated influenza virus induces protective immune responses. *Vaccine* [Internet]. 2006 Aug;24(35–36):6110–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X06005731>
42. Ozaki T, Yauchi M, Xin K-Q, Hirahara F, Okuda K. Cross-Reactive Protection Against Influenza A Virus by a Topically Applied DNA Vaccine Encoding M Gene With Adjuvant. *Viral Immunol* [Internet]. 2005 Jun;18(2):373–80. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vim.2005.18.373>
43. Watabe S, Xin KQ, Ihata A, Liu LJ, Honsho A, Aoki I, et al. Protection against influenza virus challenge by topical application of influenza DNA vaccine. *Vaccine* [Internet]. 2001 Aug 14;19(31):4434–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483269>
44. Beignon A-S, Briand J-P, Muller S, Partidos CD. Immunization onto bare skin with synthetic peptides: immunomodulation with a CpG-containing oligodeoxynucleotide and effective priming of influenza virus-specific CD4+ T cells. *Immunology* [Internet]. 2002 Feb;105(2):204–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11872096>
45. Mawas F, Peyre M, Beignon A, Frost L, Del Giudice G, Rappuoli R, et al. Successful Induction of Protective Antibody Responses against *Haemophilus influenzae* Type b and Diphtheria after Transcutaneous Immunization with the Glycoconjugate Polyribosyl Ribitol Phosphate–Cross-Reacting Material 197 Vaccine. *J Infect Dis* [Internet]. 2004 Sep 15;190(6):1177–82. Available from: <http://jid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/423327>

46. Vogt A, Mahé B, Costagliola D, Bonduelle O, Hadam S, Schaefer G, et al. Transcutaneous anti-influenza vaccination promotes both CD4 and CD8 T cell immune responses in humans. *J Immunol* [Internet]. 2008 Feb 1;180(3):1482–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18209043>
47. Frolov VG, Seid RC, Odutayo O, Al-Khalili M, Yu J, Frolova OY, et al. Transcutaneous delivery and thermostability of a dry trivalent inactivated influenza vaccine patch. *Influenza Other Respi Viruses* [Internet]. 2008 Mar;2(2):53–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-2659.2008.00040.x>
48. MISHRA D, DUBEY V, ASTHANA A, SARAF D, JAIN N. Elastic liposomes mediated transcutaneous immunization against Hepatitis B. *Vaccine* [Internet]. 2006 May 29;24(22):4847–55. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X06002763>
49. Liang R, Zhuang F, Meng Z, Deng M, Zheng C, Duan M. A New Potent Route of DNA Vaccine Inoculation: DNA-Liposome Complexes on Bare Skin Induce Antigen-Special Antibody Responses. *Molecules* [Internet]. 2003 Jan 31;8(1):120–6. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/8/1/120/>
50. Wang J, Hu J, Li F, Liu G, Zhu Q, Liu J, et al. Strong cellular and humoral immune responses induced by transcutaneous immunization with HBsAg DNA?cationic deformable liposome complex. *Exp Dermatol* [Internet]. 2007 Sep;16(9):724–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0625.2007.00584.x>
51. Mishra D, Mishra PK, Dabadghao S, Dubey V, Nahar M, Jain NK. Comparative evaluation of hepatitis B surface antigen–loaded elastic liposomes and ethosomes for human dendritic cell uptake and immune response. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2010 Feb;6(1):110–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963409000872>
52. Jain V, Vyas SP, Kohli D V. Well-defined and potent liposomal hepatitis B vaccines adjuvanted with lipophilic MDP derivatives. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2009 Sep;5(3):334–44. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963409000045>
53. VYAS S, SINGH R, JAIN S, MISHRA V, MAHOR S, SINGH P, et al. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) for non-invasive topical genetic immunization against hepatitis B. *Int J Pharm* [Internet]. 2005 May 30;296(1–2):80–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517305001547>
54. Rodrigues JF, Mathias-Santos C, Sbrogio-Almeida ME, Amorim JH, Cabrera-Crespo J, Balan A, et al. Functional diversity of heat-labile toxins (LT) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*: Differential enzymatic and immunological activities of LT1 (hLT) and LT4 (pLT). *J Biol Chem*. 2011;286(7):5222–33.
55. Amorim JH, Pereira Bizerra RS, dos Santos Alves RP, Sbrogio-Almeida ME, Levi JE, Capurro ML, et al. A Genetic and Pathologic Study of a DENV2 Clinical Isolate Capable of Inducing Encephalitis and Hematological Disturbances in Immunocompetent Mice. *PLoS One*. 2012;7(9):1–12.
56. Kapoor M, Zhang L, Mohan PM, Padmanabhan R. Synthesis and characterization of an infectious dengue virus type-2 RNA genome (New Guinea C strain). *Gene* [Internet]. 1995 Sep;162(2):175–80. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037811199500332Z>
57. Ferreira GP, Figueiredo LB, Coelho LFL, S PA, Cecilio AB, Ferreira PCP, et al. Dengue virus 3 clinical isolates show different patterns of virulence in experimental mice infection. *Microbes Infect* [Internet]. 2010 Jul [cited 2015 Sep 10];12(7):546–54. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457910000766>
58. Santos CM dos. Toxinas termo-lábeis (LTs) do tipo II de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC): efeito adjuvante e atividade inflamatória. [Internet]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2014. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-15122014-125225/>
59. Amorim JH, Porchia BFMM, Balan A, Cavalcante RCM, da Costa SM, de Barcelos Alves AM, et al. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *J Virol Methods*. 2010 Aug;167(2):186–92.

60. Lasaro M a., Mathias-Santos C, Rodrigues JF, Ferreira LCS. Functional and immunological characterization of a natural polymorphic variant of a heat-labile toxin (LT-I) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): RESEARCH ARTICLE. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009;55(1):93–9.
61. Timiryasova TM, Bonaparte MI, Luo P, Zedar R, Hu BT, Hildreth SW. Optimization and validation of a plaque reduction neutralization test for the detection of neutralizing antibodies to four serotypes of dengue virus used in support of dengue vaccine development. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88(5):962–70.
62. Henriques HR, Rampazo E V, Gonçalves AJS, Vicentin ECM, Amorim JH, Panatieri RH, et al. Targeting the non-structural protein 1 from dengue virus to a dendritic cell population confers protective immunity to lethal virus challenge. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2013;7(7):e2330. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3715404&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
63. Cintra MJ. Impacto da Imunidade Prévia nos Efeitos Adjuvantes da Toxina Termo-Lábil (LT) de *Escherichia coli* Enterotoxigênica. Universidade de São Paulo; 2015.
64. Lasaro MAS, Rodrigues JF, Mathias-Santos C, Guth BEC, Régua-Mangia A, Ferreira AJP, et al. Production and release of heat-labile toxin by wild-type human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;48(1):123–31.
65. Putnak R, Barvir D a, Burrous JM, Dubois DR, D’Andrea VM, Hoke CH, et al. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J Infect Dis*. 1996;174(6):1176–84.
66. Glenn GM, Scharton-Kersten T, Vassell R, Mallett CP, Hale TL, Alving CR. Transcutaneous immunization with cholera toxin protects mice against lethal mucosal toxin challenge. *J Immunol*. 1998;161(7):3211–4.
67. Glenn GM, Taylor DN, Li X, Frankel S, Montemarano A, Alving CR. Transcutaneous immunization: a human vaccine delivery strategy using a patch. *Nat Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2000 Dec 1 [cited 2015 Jun 19];6(12):1403–6. Available from: http://www.nature.com/nm/journal/v6/n12/pdf/nm1200_1403.pdf
68. Matsuo K, Yokota Y, Zhai Y, Quan YS, Kamiyama F, Mukai Y, et al. A low-invasive and effective transcutaneous immunization system using a novel dissolving microneedle array for soluble and particulate antigens. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;161(1):10–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.033>
69. Zhang J, Shi Z, Kong FK, Jex E, Huang Z, Watt JM, et al. Topical application of *Escherichia coli*-vectored vaccine as a simple method for eliciting protective immunity. *Infect Immun*. 2006;74(6):3607–17.
70. Vogt A, Mahé B, Costagliola D, Bonduelle O, Hadam S, Schaefer G, et al. Transcutaneous anti-influenza vaccination promotes both CD4 and CD8 T cell immune responses in humans. *J Immunol*. 2008;180(3):1482–9.
71. Slifka MK, Leung DYM, Hammarlund E, Raué HP, Simpson EL, Tofte S, et al. Transcutaneous yellow fever vaccination of subjects with or without atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):439–47.
72. Belyakov IM, Ahlers JD. Simultaneous Approach Using Systemic, Mucosal and Transcutaneous Routes of Immunization For Development of Protective HIV-1 Vaccines. *Curr Med Chem*. 2011;18(26):3953–62.
73. Rancan F, Amselgruber S, Hadam S, Munier S, Pavot V, Verrier B, et al. Particle-based transcutaneous administration of HIV-1 p24 protein to human skin explants and targeting of epidermal antigen presenting cells. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;176(1):115–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.12.022>

74. Hirschberg H, Van Kuijk S, Loch J, Jiskoot W, Bouwstra J, Kersten G, et al. A combined approach of vesicle formulations and microneedle arrays for transcutaneous immunization against hepatitis B virus. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;46(1–2):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.01.013>
75. Ding Z, Verbaan FJ, Bivas-Benita M, Bungener L, Huckriede a., van den Berg DJ, et al. Microneedle arrays for the transcutaneous immunization of diphtheria and influenza in BALB/c mice. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;136(1):71–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.01.025>
76. Raviprakash K, Sun P, Raviv Y, Luke T, Martin N, Kochel T. Dengue virus photo-inactivated in presence of 1,5-iodonaphthylazide (INA) or AMT, a psoralen compound (4'-aminomethyl-trioxsalen) is highly immunogenic in mice. *Hum Vaccines Immunother.* 2013;9(11):2336–41.
77. Maves RC, Castillo Oré RM, Porter KR, Kochel TJ. Immunogenicity of a psoralen-inactivated dengue virus type 1 vaccine candidate in mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(2):304–6.
78. Jarmer J, Zlatkovic J, Tsouchnikas G, Vratskikh O, Strauss J, Aberle JH, et al. Variation of the Specificity of the Human Antibody Responses after Tick-Borne Encephalitis Virus Infection and Vaccination. *J Virol* [Internet]. 2014;88(23):13845–57. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02086-14>
79. Midgley CM, Bajwa-Joseph M, Vasanawathana S, Limpitkul W, Wills B, Flanagan A, et al. An in-depth analysis of original antigenic sin in dengue virus infection. *J Virol.* 2011;85(1):410–21.
80. Moreland NJ, Susanto P, Lim E, Tay MYF, Rajamanonmani R, Hanson BJ, et al. Phage display approaches for the isolation of monoclonal antibodies against dengue virus envelope domain III from human and mouse derived libraries. *Int J Mol Sci.* 2012;13(3):2618–35.
81. Wahala WMPB, Kraus A a., Haymore LB, Accavitti-Loper MA, de Silva AM. Dengue virus neutralization by human immune sera: Role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;392(1):103–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.06.037>
82. Halstead SB. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2014 Dec 10;2(6). Available from: <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014>
83. Putnak JR, Collier BA, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I, et al. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine.* 2005;23(35):4442–52.
84. Nicolas J-F, Guy B. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. 2008 Oct;7(8):1201–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18844594>
85. WIDERA G, JOHNSON J, KIM L, LIBIRAN L, NYAM K, DADDONA P, et al. Effect of delivery parameters on immunization to ovalbumin following intracutaneous administration by a coated microneedle array patch system. *Vaccine* [Internet]. 2006 Mar 6;24(10):1653–64. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X05010157>
86. Yasuda T, Ura T, Taniguchi M, Yoshida H. Intradermal Delivery of Antigens Enhances Specific IgG and Diminishes IgE Production: Potential Use for Vaccination and Allergy Immunotherapy. Karagiannis SN, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016 Dec 14;11(12):e0167952. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0167952>
87. Major AS, Cuff CF. Effects of the route of infection on immunoglobulin G subclasses and specificity of the reovirus-specific humoral immune response. *J Virol* [Internet]. 1996 Sep;70(9):5968–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8709219>
88. Ishii Y, Nakae T, Sakamoto F, Matsuo K, Matsuo K, Quan YS, et al. A transcutaneous vaccination system using a hydrogel patch for viral and bacterial infection. *J Control Release.* 2008;131(2):113–20.

89. Koutsonanos DG, Martin MDP, Zarnitsyn VG, Sullivan SP, Compans RW, Prausnitz MR, et al. Transdermal influenza immunization with vaccine-coated microneedle arrays. *PLoS One*. 2009;4(3).
90. Matsuo K, Ishii Y, Quan YS, Kamiyama F, Mukai Y, Yoshioka Y, et al. Transcutaneous vaccination using a hydrogel patch induces effective immune responses to tetanus and diphtheria toxoid in hairless rat. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;149(1):15–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.05.012>
91. Combadiere B, Liard C. Transcutaneous and intradermal vaccination. *Hum Vaccin* [Internet]. 2011 Aug 27;7(8):811–27. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/hv.7.8.16274>
92. Flipse J, Smit JM. The Complexity of a Dengue Vaccine: A Review of the Human Antibody Response. Simmons CP, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015 Jun 11;9(6):e0003749. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003749>
93. Tsai W-Y, Lai C-Y, Wu Y-C, Lin H-E, Edwards C, Jumnainsong A, et al. High-Avidity and Potently Neutralizing Cross-Reactive Human Monoclonal Antibodies Derived from Secondary Dengue Virus Infection. *J Virol* [Internet]. 2013 Dec 1;87(23):12562–75. Available from: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.00871-13>
94. Lau L, Green AM, Balmaseda A, Harris E. Antibody avidity following secondary dengue virus type 2 infection across a range of disease severity. *J Clin Virol* [Internet]. 2015 Aug;69:63–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653215001870>
95. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol* [Internet]. 2016 Jun 23;17(9):1102–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/doi/10.1038/ni.3515>
96. Amorim JH, Diniz MO, Cariri F a MO, Rodrigues JF, Bizerra RSP, Gonçalves AJS, et al. Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. *Vaccine*. 2012;30(5):837–45.
97. Batista MT, Souza RD, Ferreira EL, Robinette R, Crowley PJ, Rodrigues JF, et al. Immunogenicity and In Vitro and In Vivo Protective Effects of Antibodies Targeting a Recombinant Form of the *Streptococcus mutans* P1 Surface Protein. *Infect Immun* [Internet]. 2014;82(12):4978–88. Available from: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.02074-14>
98. Dejnirattisai W, Wongwiwat W, Supasa S, Zhang X, Dai X, Duangchinda T, et al. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. 2015;16(2).
99. Smith S a, Kose N, Jadi RS, Silva AM De, Crowe JE, Vanderbilt T. Isolation of Dengue Virus-Specific Memory B Cells with Live Virus Antigen from Human Subjects following Natural Infection Reveals the Presence of Diverse Novel Functional Groups of Antibody Clones. 2014;103038(August):12233–41.
100. Vratskikh O, Stiasny K, Zlatkovic J, Tsouchnikas G, Jarmer J, Karrer U, et al. Dissection of Antibody Specificities Induced by Yellow Fever Vaccination. *PLoS Pathog*. 2013;9(6).
101. Hadinegoro SR, Arredondo-García JL, Capeding MR, Deseda C, Chotpitayasunondh T, Dietze R, et al. Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Sep 24;373(13):1195–206. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1506223>
102. Precioso AR, Palacios R, Thomé B, Mondini G, Braga P, Kalil J. Clinical evaluation strategies for a live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* [Internet]. 2015 Dec;33(50):7121–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X1501395X>
103. Weiskopf D, Angelo MA, Bangs DJ, Sidney J, Paul S, Peters B, et al. The Human CD8 + T Cell Responses Induced by a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Are Directed against Highly Conserved Epitopes. Diamond MS, editor. *J Virol* [Internet]. 2015 Jan 1;89(1):120–8. Available from: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.02129-14>

104. Putnak R, Cassidy K, Conforti N, Lee R, Sollazzo D, Truong T, et al. Immunogenic and protective response in mice immunized with a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype made in fetal rhesus lung cells. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55(5):504–10.
105. Staropoli I, Frenkiel MP, Mégret F, Deubel V. Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice. *Vaccine.* 1997;15(17–18):1946–54.
106. Costa SM, Paes M V., Barreto DF, Pinhão AT, Barth OM, Queiroz JLS, et al. Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine* [Internet]. 2006 Jan;24(2):195–205. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X05007358>
107. Alves RP dos S, Pereira LR, Fabris DLN, Salvador FS, Santos RA, Zanotto PM de A, et al. Production of a Recombinant Dengue Virus 2 NS5 Protein and Potential Use as a Vaccine Antigen. Burns DL, editor. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 2016 Jun;23(6):460–9. Available from: <http://cvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/CVI.00081-16>
108. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010 Dec;8(12):S7–16. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2460>
109. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J Clin Virol* [Internet]. 2012 Dec;55(4):289–95. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653212003435>